

# Calogênese em *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake em Diferentes Concentrações de Reguladores de Crescimento

Desiane Amaral de Deus<sup>1</sup>, Kelly Carla Almeida de Souza<sup>2</sup>, Mariana Silva Duarte<sup>1</sup>, Regina Paula Willemen Pereira<sup>3</sup>, Maria Beatriz de Oliveira Monteiro<sup>3</sup> e Heber dos Santos Abreu<sup>4</sup>

## Introdução

*Eucalyptus urophylla* S.T. Blake tem sido implantado intensivamente em programas de melhoramento genético, principalmente seu híbrido, *Eucalyptus urograndis*. Por apresentar boa capacidade de regeneração e um rápido crescimento essa espécie se tornou de grande interesse para o estudo de técnicas que visam cultura de tecido e formação de calos. Depois de formado, o calo pode dar origem a diferentes órgãos, dependendo do interesse da pesquisa, sendo que essa formação é induzida por diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Segundo Sinnott [1] o estímulo que induz a formação do calo ocorre pela ação endógena do balanço de auxina e citocinina. O tipo e a concentração destes reguladores de crescimento influenciam na multiplicação *in vitro*, onde freqüentemente a melhor faixa situa-se entre 0,5 e 5,0mg.L<sup>-1</sup> para ambos reguladores de crescimento [2].

O TDZ, excelente estimulante para formação de calos em concentrações iguais ou maiores do que 1,0mg.L<sup>-1</sup> [3], também tem sido utilizado na micropropagação.

O objetivo desse trabalho foi analisar qualitativa e quantitativamente o crescimento e o desenvolvimento de calos de *E. urophylla*, em diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) + ANA (ácido naftalenoacético) e TDZ ([1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)uréia]) + ANA, visando maior eficiência na produção de calos.

## Material e Métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Madeira, do Instituto de Florestas, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (IF/UFRRJ). Sementes de *E. urophylla*, após a assepsia com hipoclorito de sódio, tween 20 e peróxido de hidrogênio, foram inoculadas em meio MS [4] para germinação. Decorridos 60 dias as plântulas que se apresentaram mais vigorosas tiveram seus ápices foliares retirados e inoculados em meio de cultura MS acrescido de reguladores de crescimento. Cada tratamento foi acondicionado em frascos “tipo maionese”, sendo que cada frasco continha 25mL de meio de cultura e cinco explantes. Quatro repetições foram realizadas para cada tratamento.

Para a avaliação dos tipos e concentrações de

reguladores na calogênese foram utilizadas as combinações: 2,4-D + ANA, respectivamente, em mg/l: T1 (1,0+0,1); T2 (0,5+ 0); T3 (0,5+ 0,1); T4 (0,5+0,5); e das combinações de TDZ + ANA, respectivamente, em mg.L<sup>-1</sup>: T5 (0,5+0,1); T6 (1,0+ 0,1); T7 (0,5+ 0,5); e T8 (0,5+0).

Durante a fase de indução de calos os frascos foram mantidos em ausência de luz por 60 dias. Decorrido esse período foram realizadas as avaliações quantitativas utilizando-se os testes “H” de Kruskal-Wallis, para o número de calos em cada tratamento, e o teste “U” de Mann-Whitney, para os tamanhos dos calos nos tratamentos 1 e 5. Estes apresentaram os resultados mais expressivos quanto ao número e ao desenvolvimento dos calos. A friabilidade foi avaliada por resistência mecânica à manipulação.

## Resultados e discussão

Os resultados indicaram que T5 apresentou o melhor resultado induzindo calos de *E. urophylla* mais desenvolvidos, em maior quantidade (Fig. 3) e com aspecto mais friável (Tab. 1). Demonstraram ainda que a auxina sintética ANA, mesmo na pequena quantidade (0,1mg.L<sup>-1</sup>), influenciou significativamente na calogênese, pois quando esta encontrava-se ausente (T2 e T8) não ocorreu formação de calos.

Embora T5 tenha sido o mais eficaz no que se refere à friabilidade e tamanho de calos (Fig. 1), T1 apresentou resultado relevante no que se refere ao número de calos produzidos, apesar destes não terem apresentado o mesmo aspecto friável observado em T5 (Fig. 2).

Acredita-se que a concentração de 0,1mg.L<sup>-1</sup> de ANA tenha sido a mais adequada para a formação de calos, uma vez que T5 e T1 resultaram num maior número de calos.

Segundo Kaneda et al. [5], o melhor desempenho do TDZ, aparentemente, pode estar relacionada à maior atividade citocinínica ou a forma de ação diferente de outras citocininas durante o processo de desdiferenciação e rediferenciação celular, como também ao fato de o deste induzir ao acúmulo de auxinas e citocininas endógenas no tecido [6].

Segundo Alves et al. [7] os melhores resultados para calejamento foram constatados nos tratamentos com os

1. Estudante de Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. E-mail: deiseiflora@bol.com.br

2. Mestranda em Ciências Ambientais e Florestais / Instituto de Florestas / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3. Doutoranda em Ciências Ambientais e Florestais / Instituto de Florestas / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

4. Professor Adjunto do Departamento de Produtos Florestais / Instituto de Florestas / Universidade Federal do Rio de Janeiro. BR, 465, Km 07.

reguladores de crescimento TDZ e ANA. A vantagem da utilização dos reguladores de crescimento TDZ e ANA foi também citada por Lu [8], cujos estudos indicaram que o TDZ apresentou maior eficiência na presença de ANA.

### Conclusão

Os reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ se mostraram eficientes na produção de calos de *E. urophylla*, no entanto apresentaram respostas diferentes quanto à friabilidade e tamanho.

Os tratamentos com 2,4-D produziram a mesma quantidade de calos por explantes que o tratamento com TDZ. Porém, este foi responsável por originar calos mais friáveis e em maiores tamanhos.

### Referências

- [1] SINNOTT, E.W. *Plant morphogenesis*. New York: McGraw Hill Book Company.1960.
- [2] MORALES, C.F.G.; LOMBARDI, S.R.B.; SOARES, P.F.; FORTES, G.R.L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. *Rev. Bras. de AGROCIÊNCIA*, v.5, n.3, 174-177, 1999.
- [3] HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Notherlands, v.33, n.2, p.105-119, 1993.
- [4] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissuecultures*. *Physiologia Pl.* v. 15, p. 473-497, 1962.
- [5] KANEDA, Y.; TABEL, Y.; NISHIMURA, S.; HARADA, K.; AKIHAMA, T.; KITAMURA, K. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Reports*, v.17, p.8-12, 1997.
- [6] MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuroninduced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachishypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiologia Plantarum*, v.94, p.268-276, 1995.
- [7] ALVES, E.C.S.C.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.39, n.5, p.421-430, 2004.
- [8] LU, C.Y. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant*, v.29, p.92-96, 1993.



**Figura 1.** Calo de *Eucalyptus urophylla* formado em presença de 0,5mg/l de TDZ e 0,1mg/l de ANA. A coloração mais clara caracteriza aspecto mais friável.

**Figura 2.** Calo de *Eucalyptus urophylla* formado em presença de 1,0mg/l de TDZ e 0,1mg/l de ANA. A coloração mais escura caracteriza aspecto menos friável.

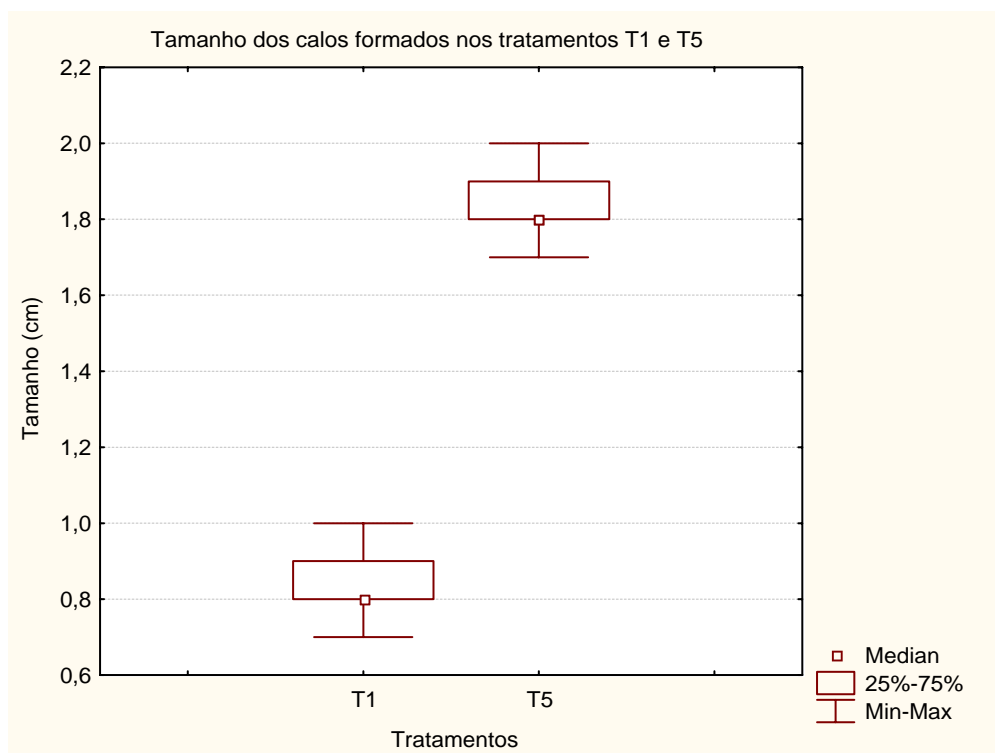
**Tabela 1-**Análise das características apresentadas pelos calos de *E. urophylla* nos diferentes tratamentos de indução.

Características dos calos produzidos / Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Mediana do tamanho dos calos (cm)	0,8*				1,8*			
Número de calos	18**	0	2	1	20**	1	1	0
Porcentagem de calos (%)	90	0	10	5	100	5	5	0
Friabilidade dos calos	+	-	+	+	+++++	+	+	-

2,4-D + ANA, em mg/l: T1 (1,0+0,1); T2 (0,5+ 0); T3 (0,5+ 0,1); T4 (0,5+0,5); e das combinações de TDZ + ANA, em mg/l: T5 (0,5+0,1); T6 (1,0+ 0,1); T7 (0,5+ 0,5); e T8 (0,5+0). O tamanho dos calos está representado pelas medianas. Para friabilidade quanto maior o número de sinais (+) mais friável. T2 e T8 não formaram calos (-).

\*Diferem estatisticamente entre si: U= 0,00; p<0,001. Os outros tratamentos não apresentaram resultados significativos para avaliação de tamanho.

\*\*São iguais entre si; diferindo dos outros tratamentos:  $H_{(7,N=32)}=23,956$ ; p=0,001.



**Figura 3-**Avaliação dos tamanhos dos calos de *E. urophylla* nos tratamentos de indução T1 e T5. T1 - 1,0mg/l de TDZ e 0,1mg/l de ANA; T5 - de 0,5mg/l de TDZ e 0,1mg/l de ANA.





